

Обеспечение условия сопоставимости результатов криоконсервирования спермиев животных

UDC 635.076: 57.043

L.V. GORBUNOV

Providing of Condition to Compare Animal Sperm Cryopreservation Results

Предложен способ анализа сохранности деконсервированных спермиев животных, который обеспечивает сопоставимость полученных результатов при работе с эякулятами, имеющими различную начальную подвижность сперматозоидов. Показано, что данный способ даёт возможность повысить воспроизводимость результатов опыта в отдельных случаях до 4,5 раз по сравнению с существующими аналогами. Проведенный сравнительный анализ при помощи различных критериев оценки достоверности различия данных криоконсервирования спермиев животных показал, что минимальный расход эякулята реализуется при использовании предложенного способа биометрической обработки с уровнем надежности $P \geq 0,95$.

Ключевые слова: воспроизводимость, сопоставимость, криоконсервирование, эффективность, спермии животных.

Запропонований спосіб аналізу збереження деконсервованих спермій тварин забезпечує зіставність одержаних результатів при роботі з еякулятами, які мають різну початкову рухливість сперматозоїдів. Показано, що даний спосіб дає можливість підвищити відтворюваність результатів дослідження в окремих випадках до 4,5 разів порівняно з існуючими аналогами. Проведений порівняльний аналіз за допомогою різних критеріїв оцінки достовірності відмінності даних криоконсервування спермій тварин показав, що мінімальна витрата еякулята реалізується при використуванні запропонованого способу біометричної обробки з рівнем надійності $P \geq 0,95$.

Ключові слова: відтворюваність, зіставність, криоконсервування, ефективність, спермії тварин.

The method for analysis of thawed animals' sperm, providing the comparability of the obtained results when working with ejaculates of different motilities has been proposed. The rise has been established in the reproducibility of the experimental results up to 4.5 times if compared with the existing analogues. Comparative analysis based on different estimation criteria of the differences of cryopreservation results for animals' sperm has shown that when using the proposed way of biometrical processing with the reliability level of 0.95 the amount of ejaculate is minimum expendable.

Key words: reproducibility, comparability, cryopreservation, efficiency, animal sperm.

Причиной сдерживания темпа развития науки является не только недостаток материальных средств, ограничивающий возможность изучения выбранного объекта, но и инерционность мышления субъекта, реализующего данный процесс. Обзор научных работ по биологии и медицине показывает [2, 5], что большая часть из них основана на использовании ошибочных методов статистической обработки или они совсем не содержат анализа представленных данных.

По мнению ведущих исследователей в области статистики [2, 5, 7, 9], существующие технологии обработки информации можно условно разделить на три уровня: низкий (параметрические критерии F, t, Ψ^2), средний (непараметрические критерии χ, χ^2, U, Z, T и др., многофакторный анализ и оптимизация) и высокий (стохастические математические модели). Для многократного повышения эффективности обработки информации применяются методы стохастического моделирования – Data

The cause of deterrence of science development rate is not only the lack of material resources, limiting the possible study of the chosen object, but also inert thinking of the individuals implementing this process. The review of scientific papers in biology and medicine demonstrates [2, 5] that many of them are based on the use of incorrect methods of statistical processing or they do not contain the analysis of the presented data at all.

On the opinion of leading researchers in the field of statistics [2, 5, 7, 9] the existing technologies of information processing may be conditionally divided into three levels: low (parametric criteria F, t, Ψ^2), average (non-parametric criteria χ, χ^2, U, Z, T etc., multi-factor analysis and optimization) and high (stochastic mathematical models). For multiple increase of the efficiency of information processing there are applied the methods of stochastic modeling, data mining [9], the task of which is the search for non-evident regularities.

Институт животноводства УААН, г. Харьков

Institute of Cattle Breeding of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov

* Адрес для корреспонденции: п/в Кулинич, Харьковский район, Харьковская область, Украина, 62404; тел.: (+38 057) 740-31-66, электронная почта: lab_cryo@ukr.net

* Address for correspondence: PO Kulinichi, Kharkov region, Ukraine 61480; tel.: +380 57 740 3166; e-mail: lab_cryo@ukr.net

Mining (англ. “получение данных”, “добыча знаний”) [9], задачей которых является поиск неочевидных закономерностей.

Показано, что максимальная воспроизводимость результатов медико-биологических исследований реализуется на основе применения парных сравнений для учёта межгрупповой вариации исследуемых параметров [2, 5]. При этом для проведения однофакторного эксперимента используют парные параметрические критерии, а многофакторного – дисперсионный анализ повторных измерений.

Вместе с тем большинство работ, посвященных криоконсервированию спермиев животных, основано на использовании непарного параметрического критерия Стьюдента t_d для установления достоверности различия значений, полученных от одного эякулята, разделённого на пары (контроль-опыт). Данный методический прием дает возможность повторять опыты на разных эякулятах при обязательном соблюдении схемы учета сопряженности контрольных и опытных проб [1, 8], однако не позволяет сравнивать результаты их сохранности вне установленных пар, поскольку в исследованиях допускается применение эякулятов быка и барана с подвижностью спермиев от 70 до 100%, рыб – 50–100% [1, 4, 8].

Таким образом, воспроизводимость результатов отдельного опыта и целого эксперимента можно определить только посредством его статистического анализа, следовательно она зависит от методов планирования исследования, его проведения и математической обработки. Проблема сопоставимости результатов сохранности деконсервированных спермиев, полученных от разных эякулятов, существенно ограничивает возможность установления корреляции между исследуемыми параметрами, построения регрессионных зависимостей и применения методов многофакторного исследования.

Цель работы – разработать способ анализа сохранности деконсервированных спермиев животных, который обеспечивает сопоставимость результатов при работе с эякулятами, имеющими разное начальное состояние.

Материалы и методы

Защитную среду для криоконсервирования спермы быка готовили по методике [8]. Замораживание спермиев осуществлялось в разработанном нами устройстве, основанном на пассивном охлаждении термоблока в горловине сосудов Дьюара X-34 ($V = 35$ л), и X-5 ($V = 5$ л) [4].

Подвижность спермиев животных в пробе определяли методом видеофиксации с точностью до 1% и визуально – 5% [1, 8]. Видеофиксацию приме-

It has been shown that maximum reproducibility of the results of medical and biological studies is implemented with basing on the application of paired comparison to take into account the variation of the studied parameters between the groups [2, 5]. Herewith to perform one-factor experiment the paired parametric criteria are used and for multi-factor one there is used the dispersion analysis of repeated measurements.

Along with this the majority of papers devoted to cryopreservation of animal spermatozoa, is based on the use of non-paired parametric Student's criterion t_d for examining the statistical significance of the difference between the values, obtained from one ejaculate, divided into pairs (control-experiment). This method gives the possibility of repeating the experiments in different ejaculates with mandatory meeting the protocol of taking into account the conjugation of the control and experiment samples [1, 8], however, does not allow the comparison of the results on their integrity beyond the set relationship, since in the studies there is admitted to apply the ejaculate with in initial motility of bovine and sheep spermatozoa from 70 to 100% and 50–100% for fish [1, 4, 8].

Thus the reproducibility of the results of a certain assay and the whole experiment may be determined only by means of its statistical analysis, therefore it depends on the methods of research planning, its performance and mathematical processing. The problem of comparability of the integrity results of frozen-thawed sperm, derived from different ejaculates, significantly limits the possibility of determining the correlation between the studied parameters, building of regression dependencies and application of the methods of multi-factor research.

The research aim is to design the method of analyzing the integrity of frozen-thawed sperm of animals, providing the comparability of the results when working with ejaculates with different initial state.

Materials and methods

Protective medium for bull sperm was prepared according Ostashko's method [8]. Sperm freezing was performed in designed by us device, based on passive cooling in neck of Dewar's vessel X-34 ($V = 35$ l) and X-5 ($V = 5$ l) [4].

Motility of animal spermatozoa in the assay was examined with video fixation with an accuracy up to 1% and visually up to 5% [1, 8]. Video fixation was applied when estimating the indices of statistical significance of the difference (control-experimental) samples, obtained from one ejaculate, in the control and experimental groups made not less than 3, the number of ejaculates was 5.

The integrity of spermatozoa in the sample was assessed according to the following expression [1, 8]:

няли при оценке показателей достоверности различия проб (контрольных и опытных), полученных из одного эякулята, а визуальный метод – для проб, полученных из нескольких эякулятов. Количество проб, полученных из одного эякулята, в контрольной и опытной группах составляло не менее 3, количество эякулятов – 5.

Сохранность спермиев в пробе оценивали по выражению [1, 8]:

$$S = \frac{n}{n_0}, \quad (1)$$

где n – количество поступательно движущихся спермиев; n_0 – общее количество спермиев в пробе (около 100).

Эффективность выбранной процедуры криоконсервирования спермиев W вычисляли как величину условной вероятности в соответствии с формулой Байеса [4, 6]:

$$W = \frac{S}{S_0}, \quad (2)$$

где S, S_0 – сохранность деконсервированных и нативных спермиев соответственно.

Сравнительный анализ методов статистической обработки результатов для деконсервированных спермиев животных проводили в контрольной и опытных группах с одинаковой и разной начальной сохранностью S_{01} и S_{02} (выражение 1). Достоверность различия сохранности спермиев и эффективность их криоконсервирования определяли на раздельном эякуляте для одной пары проб (контроль-опыт) методом альтернативного варьирования t_a , для 5 пар – с помощью парных и непарных параметрических и непараметрических критериев [2, 5, 6]. Парный критерий Стьюдента t_Δ применяли для оценки средней разности между выборками с парносопряженными параметрами, а непарный – t_d с несвязанными.

Для усредненных величин вероятностей M сохранности и эффективности ($M \geq 0,75$ или $M \leq 0,25$) использовали способ угловой трансформации Фишера $\varphi = 2\arcsin\sqrt{M}$ и критерий t_φ [2, 5, 6]. В качестве непараметрических применяли критерии: Пирсона (χ^2), Уилкоксона (T и U).

Для сравнения воспроизводимости результатов тестируемых способов анализа достоверности различия выборок среднеквадратическое отклонение рассчитывали по методу альтернативного варьирования [2, 6]:

$$\sigma_i = \sqrt{(M_i(1 - M_i))}, \quad (3)$$

$$S = \frac{n}{n_0}, \quad (1)$$

where n is number of forwardly moving spermatozoa; n_0 is total number of spermatozoa in a sample (about 100).

The efficiency of the selected cryopreservation procedure W for spermatozoa was calculated as the value of the conditional probability in accordance with the Bayes' theorem [4, 6]:

$$W = \frac{S}{S_0}, \quad (2)$$

where S and S_0 are the integrities of frozen-thawed and native spermatozoa, correspondingly.

The methods of statistical processing of the results of frozen-thawed animal spermatozoa were comparatively analyzed in the control and experimental groups with the similar and different initial integrity S_{01} and S_{02} (expression 1). The statistical significance of the difference in an integrity of spermatozoa and efficiency of their cryopreservation was determined in separated ejaculate for one pair of samples (control-experiment) by means of alternative variation t_a , for five pairs it was done with paired and non-paired parametric and non-parametric criteria [2, 5, 6]. Paired Student's criterion t_Δ was applied to estimate an average difference between the conjugated parameters in the samplings, and non-paired t_d with non-related ones.

For averaged values of probabilities, M , of integrity and efficiency ($M \geq 0.75$ or $M \leq 0.25$) there was used the method of the Fisher transformation $\varphi = 2\arcsin\sqrt{M}$ and criteria t_φ [2, 5, 6]. As non-parametric ones there were applied the Pearson's (χ^2) and Wilcoxon's (T and U) criteria.

To compare the reproducibility of the results for the tested analysis methods of statistical significance of samplings' difference the standard deviation was counted on the alternative variation method [2, 6]:

$$\sigma_i = \sqrt{(M_i(1 - M_i))}, \quad (3)$$

where i is current index, reflecting the number of the parameter to be averaged; M_0 is probability of integrity of spermatozoa (expression 1); M_1 is probability of differences of integrity mean values in the control and experiment ($M_1 = |S_1 - S_2|$); M_2 is probability of efficiency of cryopreservation (expression 2); M_3 is probability of differences of efficiency mean values, calculated for the control and experimental groups ($M_3 = |W_1 - W_2|$).

The reproducibility of the experiment results was assessed by means of variation coefficient:

где i – текущий индекс, отражающий номер способа проведения статистического анализа: M_0 – вероятность сохранности спермиев (выражение 1); M_1 – вероятность разности средних показателей сохранностей в контроле и опыте ($M_1 = |S_1 - S_2|$); M_2 – вероятность эффективности криоконсервирования (выражение 2); M_3 – вероятность разности средних показателей эффективностей, рассчитанных для контрольной и опытной групп ($M_3 = |W_1 - W_2|$).

Воспроизводимость результатов эксперимента оценивали при помощи коэффициента вариации:

$$C_{vi} = \frac{\sigma_i}{M_i} \cdot 100\%. \quad (4)$$

Повышение воспроизводимости результатов z_1 определяли как отношение коэффициентов вариаций, полученных из величины среднеквадратического отклонения показателя сохранности спермиев S и разности сохранности спермиев, оцененных в контроле и опыте $\Delta S = |S_1 - S_2|$:

$$z_1 = \sqrt{\frac{S(1-S)}{\Delta S(1-\Delta S)}}. \quad (5)$$

Аналогично определяли повышение воспроизводимости z_2 при использовании показателя эффективности W и его разности в контроле и опыте $\Delta W = |W_1 - W_2|$ для вычисления z_3 :

$$z_2 = \frac{W}{S} \sqrt{\frac{S(1-S)}{W(1-W)}}, \quad (6)$$

$$z_3 = \frac{W}{S} \sqrt{\frac{S(1-S)}{\Delta W(1-\Delta W)}}. \quad (7)$$

Повышение воспроизводимости результатов z_4 , обусловленных отношением коэффициентов вариаций, полученных из разности величин сохранности и эффективности в контроле и опыте:

$$z_4 = \frac{W}{S} \sqrt{\frac{\Delta S(1-\Delta S)}{\Delta W(1-\Delta W)}}. \quad (8)$$

Минимальное количество эякулятов N , обеспечивающих достоверное среднее значение сохранности спермиев (выражение 1) и эффективности их криоконсервирования (выражение 2) с уровнем надежности $P \geq 0,95$, определяли по [3]:

$$N = \left(\frac{t}{p} C_v \right)^2, \quad (9)$$

$$C_{vi} = \frac{\sigma_i}{M_i} \cdot 100\%. \quad (4)$$

An increase of reproducibility results z_1 was defined as the ratio of the variation coefficients, derived from the value of standard deviation of the integrity indices of spermatozoa S and difference of spermatozoa integrity in the control and experiment $\Delta S = |S_1 - S_2|$:

$$z_1 = \sqrt{\frac{S(1-S)}{\Delta S(1-\Delta S)}}. \quad (5)$$

In the same way there was determined the rise in reproducibility z_2 when using the efficiency index W and its differences in the control and experiment $\Delta W = |W_1 - W_2|$ to calculate z_3 :

$$z_2 = \frac{W}{S} \sqrt{\frac{S(1-S)}{W(1-W)}}, \quad (6)$$

$$z_3 = \frac{W}{S} \sqrt{\frac{S(1-S)}{\Delta W(1-\Delta W)}}. \quad (7)$$

Increase in reproducibility of the results z_4 stipulated with the ratio of the variation coefficients and obtained from the difference values of integrity and efficiency in the control and experiment was counted on the formula:

$$z_4 = \frac{W}{S} \sqrt{\frac{\Delta S(1-\Delta S)}{\Delta W(1-\Delta W)}}. \quad (8)$$

Minimal number of ejaculates N , providing the statistically significant mean value of spermatozoa integrity (expression 1) and the efficiency of their cryopreservation (expression 2) with the reliability level $P \geq 0.95$ was determined according to the formula [3]:

$$N = \left(\frac{t}{p} C_v \right)^2, \quad (9)$$

where t is Student's criterion (if the number of ejaculates $k = 5$, $t = 2.78$); p is admissible relative error ($p = 5\%$).

Correlation of spermatozoa initial state with the values of their post-thaw integrity and efficiency of this procedure was examined by means of Pearson criterion r [2, 5, 6]. The obtained indices of integrity and efficiency were expressed in percentage.

Results and discussion

At the first research stage to determine the application conditions for existing criteria of statistical significance of the integrity difference of animal spermatozoa with similar initial state S_0 in the control and

где t – критерий Стьюдента (для количества образцов эякулята $k = 5$, $t = 2,78$); p – допустимая относительная ошибка, выраженная в процентах, $p = 5\%$.

Корреляцию начального состояния спермиев с величинами их сохранности после криоконсервирования и эффективностью данной процедуры определяли при помощи критерия Пирсона r [2, 5, 6]. Полученные показатели сохранности и эффективности выражали в процентах.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования для определения условий применимости существующих критериев достоверности различия сохранности спермиев животных, имеющих одинаковое начальное состояние S_0 в контрольной и опытных группах, проведен анализ выборок, составленных по аналогии с экспериментально полученными данными [4] (табл. 1).

Начальная сохранность спермиев изменялась от 70 до 90% с шагом 5%. Показатели сохранности в опытной и контрольной группах определяли из выражения (2), с учетом погрешности визуального способа оценки подвижности спермиев 5%, по установленным показателям эффективности криоконсервирования спермиев в контрольной $W_1 = 55\%$ и опытной $W_2 = 50\%$ группах.

Методом альтернативного варьирования t_a получена достоверность различия в опыте и контроле $P \geq 0,95$ для показателя эффективности W . Максимальная достоверность различия $P \geq 0,999$ наблюдается для показателей эффективности криоконсервирования с применением непарных $t_a = 3,73$ и парных $t_{\Delta} = 3,50$ ($P \geq 0,99$) критериев Стьюдента, предназначенных для оценки различия средних разностей (контроль-опыт) и средней разности между выборками. Для сохранности получена достоверность различия $P \geq 0,99$ при использовании парного критерия Стьюдента $t_{\Delta} = 3,58$.

Менее пригодным оказался общепринятый непарный критерий Стьюдента t_a оценки разности средних величин сохранностей спермиев $P < 0,95$. Применение непараметрического критерия χ^2 не

Таблица 1. Сохранность деконсервированных спермиев, полученных из эякулятов с одинаковой начальной подвижностью S_0 в контрольной и опытных группах

Table 1. Integrity of thawed spermatozoa derived from ejaculates with similar initial motility S_0 in the control and experimental groups

Номер пробы Sample	Сохранность,% Integrity,%					Эффективность,% Efficiency,%			
	S_0	S_1	S_2	$S_1 - S_2$	t_a	W_1	W_2	$W_1 - W_2$	t_a
1	90	50	45	5,0	1,74	55,6	50,0	5,6	1,93 a
2	85	50	45	5,0	1,74	58,8	52,9	5,9	2,06 a
3	80	45	40	5,0	1,75	56,3	50,0	6,3	2,17 a
4	75	40	40	0,0	0,00	53,3	53,3	0,0	0,00
5	70	40	35	5,0	1,79	57,1	50,0	7,1	2,49 a
Статистические параметры оценки Statistical parameters of assessment									
\bar{P}	80,0	45,0	41,0	4,0	–	56,2	51,3	5,0	–
C_v	9,9	11,1	10,2	5,2	–	3,6	3,3	5,3	–
N	30	38	32	8	–	4	3	9	–
t	–	1,23	3,58 b	–	–	3,73 c	3,50 b	–	–

Примечание: S_1 и S_2 – сохранность спермиев в контроле и опыте после криоконсервирования; W_1 и W_2 – эффективность криоконсервирования в контроле и опыте; параметрические критерии анализа достоверности различия Стьюдента: непарные для одной пары проб – t_a , пяти – t_a ; парные – t_{Δ} ; \bar{P} – средняя величина вероятности сохранности спермиев S (и эффективности их криоконсервирования W), N – минимальное количество эякулята, обеспечивающего достоверное среднее значение $P \geq 0,95$, C_v – коэффициент вариации, %; a , b и c – уровни надежности достоверности различия средних значений 0,95, 0,99 и 0,999 соответственно.

Notes: S_1 and S_2 are sperm integrity values in the control and experimental samples after cryopreservation; W_1 and W_2 are cryopreservation efficiencies in the control and experimental groups; parametric criteria in Student's analysis of differences' significance: non-paired for one pair of samples are t_a ; for five pairs are t_a ; paired criteria are t_{Δ} ; \bar{P} is mean value of probability for sperm integrity, S (and their cryopreservation efficiency, W); N is minimal number of ejaculates providing significant mean value $P \geq 0.95$; C_v is variation coefficient, %; a , b and c are statistical significance reliability levels of the differences of means, 0.95, 0.99 and 0.999, correspondingly.

experimental groups there were analyzed the samplings composed on the analogy of experimental findings [4] (Table 1).

Initial integrity of spermatozoa changed from 70 to 90% with 5% step. The integrity indices in experimental and control groups were derived from the expression (2) with taking into account an error of visual assessment of spermatozoa motility 5% on the determined indices of cryopreservation efficiency for the spermatozoa in the control $W_1 = 55\%$ and experimental $W_2 = 50\%$ groups.

By the method of alternative variation, t_a , the statistical significance of difference in the experimental and control groups $P \geq 0.95$ was obtained for the efficiency index W . Maximum statistical significance of

обеспечило достоверности различия проб, полученных в контрольной и опытной группах ($P < 0,95$). Использование критерия Уилкоксона T обеспечивает уровень надежности различия $P \geq 0,95$ не менее чем для 7 эякулятов.

На следующем этапе исследования проведен сравнительный анализ методов статистической обработки результатов деконсервированных спермиев, имеющих разную начальную сохранность в контрольной и опытных группах S_{01} и S_{02} (табл. 2). Начальная сохранность спермиев изменялась ступенчато в контрольной группе от 70 до 90% и в опытной от 70 до 80% с шагом 5%. Различие начального состояния спермиев, оцененное по критерию Стьюдента $t_{\phi} = 1,91$ в сравниваемых группах, оказалось недостоверным $P < 0,95$.

Для оценки влияния различия начального состояния спермиев на показатели их сохранности после криоконсервирования поменяли местами величины эффективности в контрольной $W_1 = 50\%$ и опытной $W_2 = 55\%$ группах. Достоверность различия начального состояния спермиев в опытной и контрольной группах, оцененного непарным критерием Стьюдента, имеет положительный знак, а сохранность деконсервированных спермиев –

the difference $P \geq 0.999$ was observed for the indices of cryopreservation efficiency with applying non-paired $t_d = 3.73$ and paired $t_{\Delta} = 3.50$ ($P \geq 0.99$) Student's criteria, designated for the estimation of differences of the mean differences (in control and experimental groups) and average difference between current values (obtained in these groups). For spermatozoa integrity there was obtained the statistical significance of the difference $P \geq 0.99$ when using the paired Student's criterion $t_{\Delta} = 3.58$.

Less suitable occurred to be traditional non-paired Student's criterion t_d for estimation of the mean values for spermatozoa integrity $P < 0.95$. Application of non-parametric criterion χ^2 did not provide statistically significant differences of assays obtained in the control and experimental groups ($P < 0.95$). Use of Wilcoxon's T criterion provides the reliability level of the difference $P \geq 0.95$ not less than for 7 ejaculates.

At the following research stage there has been performed a comparative analysis of the methods of statistical processing of the results for frozen-thawed spermatozoa with different initial integrity in the control and experimental groups S_{01} and S_{02} (Table 2). Initial integrity of spermatozoa changed stepwise in the control group from 70 to 90% and from 70 to 80% with 5% step in experimental one. The difference of initial state of spermatozoa, estimated according to Student's criterion $t_{\phi} = 1.91$ in the groups to be compared, occurred to be statistically insignificant $P < 0.95$.

To estimate the effect of different initial state of spermatozoa on the indices of their integrity after cryopreservation the efficiency values in the control $W_1 = 50\%$ and experimental $W_2 = 55\%$ groups were switched. The statistical significance of initial state of spermatozoa in the experimental and control groups assessed with non-paired Student's criterion is positive value and the integrity of thawed spermatozoa is a negative, $t_d = -1.46$ ($P < 0.95$). The use of non-parametric Wilcoxon criteria provides the reliability level of the difference $P \geq 0.95$ with the number of assays derived from more than 10 ejaculates.

Statistical insignificance of the deviation of initial state of spermatozoa (Table 2) does not provide the statistically significant difference of their integrity under the same cryopreservation conditions ($W_1 = 50\%$ and experimental $W_2 = 55\%$), as well as in the first experiment $W_1 = 55\%$ and experimental $W_2 = 50\%$ (Table 1). Therefore insignificant difference of spermatozoa initial state integrity means $\bar{S}_{01} - \bar{S}_{02} = 4\%$ (an error of visual

Таблица 2. Сохранность деконсервированных спермиев, полученных из эякулятов с разной начальной подвижностью в контрольной S_{01} и опытной S_{02} группах

Table 2. Integrity of thawed spermatozoa derived from ejaculates with different initial motility in the control S_{01} and experimental S_{02} groups

Номер пробы Sample	Сохранность, % Integrity, %						Эффективность, % Efficiency, %	
	S_{01}	S_{02}	S_1	S_2	S_1^1	S_2^1	W_1	W_2
1	90	80	45	45	45	50,5	50,0	56,1
2	85	80	40	45	40	47,8	47,1	56,2
3	80	75	40	40	40	42,8	50,0	53,4
4	75	75	40	40	40	40	53,3	53,3
5	70	70	35	40	35	40	50,0	57,1
Статистические параметры оценки Statistical parameters of assessment								
M	80,0	76,0	40,0	42,0	40,0	44,2	50,1	55,2
C_v	9,9	5,5	8,8	6,5	8,8	10,7	4,4	3,2
N	30	9	24	13	24	35	6	3
t	1,91		-1,46		-1,42		-3,66	

Примечание: см. табл. 1; S_1^1 и S_2^1 – приведенные величины сохранности (8) полученные для контрольной и опытной групп.

Notes: see the Table 1; S_1^1 and S_2^1 are integrity values (expression 8), obtained for the control and experimental groups.

отрицательный $t_d = -1,46$ ($P < 0,95$). Использование непараметрических критериев Уилкоксона обеспечивает уровень надежности различия $P \geq 0,95$, при количестве проб, полученных более чем из 10 эякулятов.

Недостоверность расхождения начального состояния спермиев (табл. 2) не обеспечивает достоверного различия их сохранности при тех же условиях криоконсервирования ($W_1 = 50\%$ и $W_2 = 55\%$), как и в первом опыте ($W_1 = 55\%$ и $W_2 = 50\%$). Следовательно, незначительное различие средних показателей сохранности начального состояния спермиев $\bar{S}_{01} - \bar{S}_{02} = 4\%$ (ошибка визуального определения подвижности спермиев составляет 5%) может влиять на результат оценки выбранного способа криоконсервирования.

Для сопоставления величин сохранности деконсервированных спермиев, полученных из разных эякулятов $S_{01} \neq S_{02}$, предложен следующий способ. Вычисление показателей сохранности спермиев и эффективности их криоконсервирования в контрольных пробах производили из выражений (1) и (2). В опытной группе определяли среднюю величину эффективности \bar{W}_2 для проб, в которых совпадали значения начальной сохранности с контролем ($S_{i01} = S_{i02}$):

$$\bar{W}_2 = \frac{\sum_{i=1}^h W_{i2}}{h}, \quad (10)$$

где W_{i2} – эффективность (выражение 2) криоконсервирования спермиев в i -й опытной группе; h – количество эякулятов, имеющих одинаковые значения начальной сохранности в контрольной и опытных группах.

Для сравнения показателей сохранности деконсервированных спермиев, полученных в опытных пробах, с контролем (при разной начальной сохранности $S_{01} \neq S_{02}$) необходимо определить величину приведенной сохранности S_2^1 в опытных пробах:

$$S_2^1 = S_2 + (S_{01} - S_{02})\bar{W}_2. \quad (11)$$

Эффективность криоконсервирования спермиев в опытных группах

$$W_2 = \frac{S_2^1}{S_{01}}. \quad (12)$$

Результаты проверки предложенных формул (10)–(12) представлены в табл. 2. Достоверность различия $P \geq 0,999$ получена для показателя эффек-

examination of spermatozoa motility makes 5%) may affect the result of assessment of the chosen cryopreservation way.

To compare the integrity values of thawed spermatozoa obtained from different ejaculates $S_{01} \neq S_{02}$, there has been proposed the following method. The integrity and efficiency indices for spermatozoa cryopreservation in the control assays were derived from the expressions (1) and (2). In experimental group the efficiency value \bar{W}_2 was determined for the assays, wherein the values of initial integrity coincided with the control ($S_{i01} = S_{i02}$):

$$\bar{W}_2 = \frac{\sum_{i=1}^h W_{i2}}{h}, \quad (10)$$

where W_{i2} is efficiency (expression 2) of spermatozoa cryopreservation in the i -th experimental group; h is the number of ejaculates with similar values of initial integrity in the control and experimental groups.

To compare the integrity indices of frozen-thawed spermatozoa obtained in the experimental assays with the control (at different initial integrity $S_{01} \neq S_{02}$) it is necessary to determine the value of the S_2^1 reduced integrity in experimental assays:

$$S_2^1 = S_2 + (S_{01} - S_{02})\bar{W}_2. \quad (11)$$

The cryopreservation efficiency of spermatozoa in experimental groups is as follows:

$$W_2 = \frac{S_2^1}{S_{01}}. \quad (12)$$

The results of checking the formulas (10)–(12) are presented in Table 2. The statistically significant differences $P \geq 0.999$ is obtained for the efficiency index, calculate by means of non-paired Student's criterion $t_d = -3.66$.

The obtained correlation coefficients $r = 0.95$ point to the relation between initial state of spermatozoa and their post-thaw integrity (Table 1, 2) and almost complete absence of that ($r = -0,12 \div 0,23$) when using the assessment efficiency index of the chosen cryopreservation protocol.

To compare the results on integrity of spermatozoa cryopreserved with different protocols it is necessary that their mean values would be obtained with the reliability level of $P \geq 0.95$. Minimal amount of ejaculate (expression 9) for the integrity index (Table 1, 2) made $13 \div 38$ (if the method of separate ejaculate was applied) and $3 \div 6$ for the efficiency (with no meeting this limitation).

тивности, вычисленного при помощи непарного критерия Стьюдента $t_d = -3,66$.

Полученные коэффициенты корреляции $r = 0,95$ указывают на наличие явной связи между начальным состоянием спермиев и их сохранностью после криоконсервирования (табл. 1 и 2) и практически полное отсутствие таковой $r = -0,12 \pm 0,23$ при использовании показателя эффективности оценки выбранного способа криоконсервирования.

Для сравнения результатов сохранности спермиев, криоконсервируемых разными способами, необходимо, чтобы их средние значения были получены с уровнем надежности $P \geq 0,95$. Минимальное количество эякулята (выражение 9) для показателя сохранности (табл. 1 и 2) составило $13 \div 38$ (при условии применения метода раздельного эякулята), а эффективности $-3 \div 6$ (без необходимости соблюдения данного ограничения).

Таким образом, применение показателя эффективности повышает воспроизводимость результатов деконсервированных спермиев в $2 \div 3$ раза (коэффициент вариации снижается от $7 \div 11$ до $3 \div 4\%$ см. табл. 1 и 2). Увеличение воспроизводимости результатов [4] происходит за счет учета связи состояния спермиев до и после их криоконсервирования (точнее через отношение этих величин, выражение 2). Аналогичным образом повышается воспроизводимость посредством применения парных критериев t_Δ [2, 5, 6], фиксирующих связь в парах контроль-опыт (через их разность).

Математическое моделирование (выражение 5) показало, что максимальное повышение воспроизводимости $z_1 = 1,8 \div 2,3$ установлено для параметра, учитывающего величину разности сохранности в опыте и контроле, составившую 5%, при сохранности деконсервированного объекта $20 \div 80\%$ (рис. 1). Увеличение расхождения сохранности в сравниваемых группах до 50% снижает воспроизводимость ($z_1 = 0,8$).

Применение показателя эффективности (выражение 6) повышает воспроизводимость результатов $z_2 = 8,7$ при эффективности криоконсервирования 90% и сохранности объекта 20% (рис. 2). Снижение величины эффективности до уровня сохранности понижает воспроизводимость $z_2 = 1,0$.

Разность показателей эффективности, рассчитанных для контрольной и опытной групп (выражение 7), обеспечивает максимальную величину воспроизводимости $z_3 = 8,3$, полученную при разнице сохранности объекта 5% и эффективности криоконсервирования 90% (рис. 3). При снижении эффективности до 50% воспроизводимость уменьшается $z_3 = 4,6$. Минимальная величина $z_3 = 1$ может быть получена, если показатель сохранности, разность эффективности и эффективность составляют 50%.

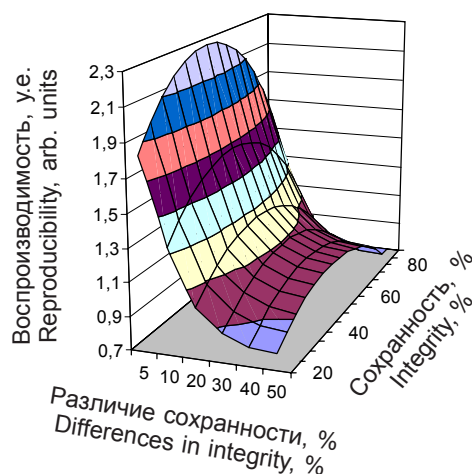


Рис. 1. Повышение воспроизводимости результатов криоконсервирования биообъекта, вычисленное как отношение коэффициентов вариации сохранности и её различия в контроле и опыте (выражение 5).

Fig. 1. Reproducibility enhancement of cryopreservation results of bioobject, counted as the ratio of integrity variation coefficients and its difference in the control and experimental groups (expression 5).

Thus the use of the efficiency index exceeds the reproducibility of the results for frozen-thawed spermatozoa in $2 \div 3$ times (variation coefficient reduces from $7 \div 11$ to $3 \div 4\%$, see Tables 1 and 2). The reproducibility of the results increases when the relationship of spermatozoa state prior to and after cryopreservation is taken into account [4], *i. e.* via the ratio of these values (expression 2). In the similar way the reproducibility of the results is enhanced by means of application of paired criteria t_Δ [2, 5, 6], which fix the relation in the pairs: control-experiment either prior to or after effect of testing factor (via their difference).

Mathematical modeling (expression 5) has shown that maximum rise in the reproducibility $z_1 = 1.8 \div 2.3$ was established for the parameter, considering the value of difference in the experimental and control groups' integrities, making 5% at the integrity of frozen-thawed object of $20 \div 80\%$ (Fig. 1). The increase in integrity deviation in the groups under comparison up to 50% reduces the reproducibility ($z_1 = 0.8$).

Use of the efficiency index (expression 6) enhances the reproducibility of the results $z_2 = 8.7$ at 90% cryopreservation efficiency and 20% object integrity (Fig. 2). The reduction of the efficiency value down to the level of integrity reduces the reproducibility $z_2 = 1.0$.

The difference of efficiency indices, calculated for the control and experimental groups (expression 7), provides the maximum reproducibility value $z_3 = 8.3$, obtained at the difference of 5% object integrity and 90% cryopreservation efficiency (Fig. 3). During the reduction of efficiency down to 50% the reproducibil-

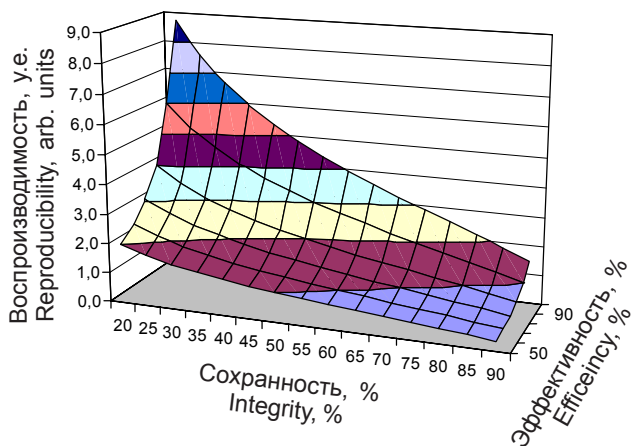


Рис. 2. Повышение воспроизводимости результатов криоконсервирования биообъекта, вычисленное как отношение коэффициентов вариации показателей сохранности и эффективности (выражение 6).

Fig. 2. Reproducibility enhancement of cryopreservation results of bioobject, counted as the ratio of integrity variation coefficients and efficiency (expression 6).

Для определения кратности повышения воспроизводимости результатов предложенного способа, по сравнению с существующим аналогом, проведен анализ данных, оцененных для параметров разности сохранности и разности эффективности (выражение 8, рис. 4). Установлено, что максимальное повышение воспроизводимости $z_4 = 4,5$ наблюдается при эффективности 90% и сохранности 20%. Снижение эффективности до 50% понижает воспроизводимость $z_4 = 2,5$. Минимальная воспроизводимость $z_4 = 1$ получена при сохранности биообъекта 50%.

Расчеты проводились при условии, что величины расхождения сохранности и эффективности равны ($\Delta S = \Delta W$). Результаты экспериментов [4] показывают, что расхождение величин сохранности превышает разности показателей эффективности $\Delta S > \Delta W$ в контроле и опыте при использовании одного способа криоконсервирования и наоборот, $\Delta S < \Delta W$ – при использовании разных способов. Необходимо учитывать, что воспроизводимость результатов зависит от соотношения величин ΔS и ΔW . Следует отметить, что при повышении воспроизводимости результатов можно сократить количество эякулята в K раз ($K = z^2$, выражение 9).

Таким образом, воспроизводимость результатов научного исследования зависит от методов планирования и проведения эксперимента, обработки полученных данных, поскольку оценить данную величину без осуществления статистического анализа невозможно. Вариация начального состояния спермиев животных (в диапазоне от 70 до 90%) значительно влияет на воспроизводимость резуль-

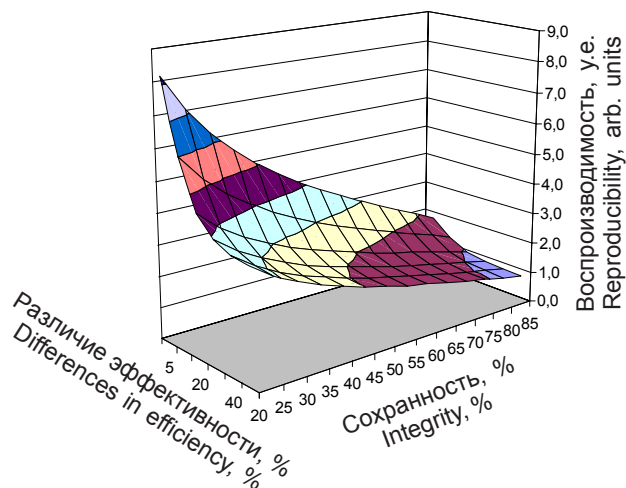


Рис. 3. Повышение воспроизводимости результатов криоконсервирования биообъекта, вычисленное как отношение коэффициентов вариации показателей сохранности и разницы эффективности в контроле и опыте (выражение 7).

Fig. 3. Reproducibility enhancement of cryopreservation results of bioobject, counted as the ratio of integrity variation coefficients and efficiency difference in the control and experimental groups (expression 7).

ity decreases $z_3 = 4.6$. Minimum value $z_3 = 1$ may be obtained if the integrity index, efficiency difference and efficiency make 50%.

For determination of multiplicity of reproducibility rise for the results of the proposed method if compared with existing analogue, there were analyzed the data assessed for the parameters of integrity difference and the one of efficiency (expression 8, Fig. 4). The maximum rise in reproducibility $z_4 = 4.5$ has been found at 90% efficiency and 20% integrity. Decrease of the efficiency down to 50% reduces the reproducibility ($z_4 = 2.5$). Minimum reproducibility $z_4 = 1$ was obtained at the bioobject integrity of 50%.

The calculations were performed under the condition that the values of deviation of integrity and efficiency were equal ($\Delta S = \Delta W$). The experimental results [4] have shown that the deviation of the integrity values exceeds the difference of the efficiency indices $\Delta S > \Delta W$ in the control and experimental group when using the same cryopreservation method, and *vice versa*, $\Delta S < \Delta W$ if using various methods. It should be taken into account that the reproducibility of the results depends on the condition of the ratio of the values ΔS and ΔW . It should be noted that when increasing the reproducibility of the results the amount of ejaculate may be reduced in K times ($K = z^2$, expression 9).

Thus the reproducibility of the scientific research results depends on the methods of planning and performing the experiment, processing of the findings, since the estimation of this value without statistical analysis is impossible. The variation of initial state of animals' spermatozoa (within the range from 70 to 90%) significantly affects the reproducibility of the cryopre-

татов криоконсервирования. Повышение воспроизводимости результатов и обеспечение их сопоставимости реализуются при использовании предложенного биометрического способа, с помощью которого можно определить условия многократного снижения количества опытов криоконсервирования суспензий клеток в процессе проведения поисковых опытов, тогда как общепринятые параметрические и непараметрические методы статистического анализа рассчитаны на обработку уже проведенного эксперимента. Методы планирования, содержащиеся в программных пакетах STADIA, SPSS-17, модулях многофакторного анализа MANOVA позволяют определить направление поиска (градиент роста целевой функции), а не условия решения поставленной задачи исследования (минимальное количество измерений, обеспечивающих достоверный результат).

Полагаем, что данный способ окажется применимым при анализе сохранности спермиев разных видов животных, человека и птицы, а также показателей их переживаемости [1, 8].

Выводы

1. Предложен биометрический способ анализа сохранности деконсервированных спермиев животных, обеспечивающий сопоставимость результатов, при работе с эякулятами, имеющими разное начальное состояние.

2. Данные математического моделирования показали, что биометрический способ повышает воспроизводимость результатов опыта до 4,5 раз в сравнении с существующими аналогами.

3. Сравнение различных методов статистического анализа данных криоконсервирования спермиев животных показало, что при использовании предложенного способа с уровнем надежности $P \geq 0,95$ необходимо минимальное количество образцов.

Литература

1. Бугров А.Д. Криоповреждение и криозащита спермиев быков при глубоком замораживании. – Харьков, 2010. – 317 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
3. Горбунов Л.В. Определение минимального количества измерений, обеспечивающего достоверный научный результат // Агроекологічний журнал. – 2002. – Вип. 1. – С. 69–71.
4. Горбунов Л.В., Бучацький Л.П. Вплив різної якості еякуляту на оцінку ефективності реалізації складових етапів криоконсервування спермів коропу // Рибне господарство. – 2007. – Вип. 1. – С. 32–35.
5. Новиков Д.А., Новочадов В.В. Статистические методы в медико-биологическом эксперименте (типичные случаи). – Волгоград: Изд-во ВГМУ, 2005. – 84 с.
6. Лакин Б.Ф. Биометрия – М.: Высш. шк., 1990. – 254 с.

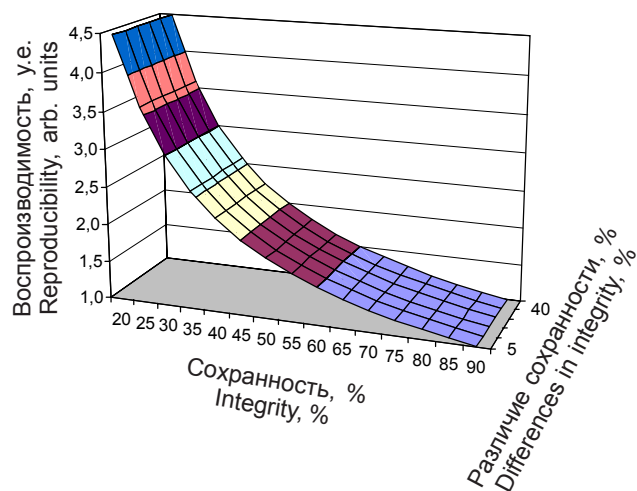


Рис. 4. Повышение воспроизводимости результатов криоконсервирования биообъекта, вычисленное как отношение коэффициентов вариации показателей, имеющих равные значения различия сохранности и эффективности в контроле и опыте (выражение 8).

Fig. 4. Reproducibility enhancement of cryopreservation results of bioobject, counted as the ratio of variation coefficients of the indices with equal values of the integrity difference and efficiency in the control and experimental groups (expression 8).

conservation results. Rise in the reproducibility of the results and providing their comparability are implemented when using the proposed biometric method, by means of which the conditions of multiple reduction of the number of experiments on cryopreservation of cell suspensions during the researches can be determined. Meanwhile traditional parametric and non-parametric methods of statistical analysis are meant for the processing of already done experiment. The methods of planning containing in the software STADIA, SPSS-17, multifactor analysis modules MANOVA, enable the determining of the search direction (growth gradient of objective function), but not the conditions of the solution of the research task set (minimal number of measurements, providing the statistical significance of the result).

This method is believed to be applied when analyzing the integrity of spermatozoa of different animal, human and avian species, as well as the indices of their survival [1, 8].

Conclusions

1. There has been proposed the biometric method for analyzing the integrity of frozen-thawed spermatozoa of animals providing the comparability of the results when working with ejaculates with different initial state.

2. The data of mathematical modeling have shown that biometric method increases the reproducibility of the experimental results up to 4.5 times if compared with the existing analogues.

7. Орлов А.И. Высокие статистические технологии // Заводская лаборатория.– 2003.– Т. 69, №11.– С. 55–60.
8. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота.– Киев: Наук. думка.– 1995.– 195 с.
9. Чубукова И.А. Data mining: Учеб. пособие.– М., 2006.– 382 с.

Поступила 25.06.2010
Рецензент С.Е. Гальченко

3. Comparison of different methods of statistical analysis for the data on cryopreservation of animals' spermatozoa has demonstrated that minimum number of ejaculates is implemented when using the proposed way with the reliability level $P \geq 0.95$.

References

1. Bugrov A.D. Cryodamage and cryoprotection of bovine sperm during deep freezing. – Kharkov, 2010. – 317p.
2. Glants S. Medico-biological statistics/ Translated from English.– Moscow: Praktika, 1998.– 459p.
3. Gorbunov L.V. Determining of minimal number of measurements, providing statistically significant scientific result // Agroekologichnyy Zhurnal.– 2002.– Issue 1.– P. 69–71.
4. Gorbunov L.V., Buchatsky L.P. Effect of different quality of ejaculate on efficiency assessment of cryopreservation constitutive stages' implementation for carp sperm// Rybne Gospodarstvo.– 2007.– Issue 1.– P. 32–35.
5. Novikov D.A., Novochadov V.V. Statistical methods in medico-biological experiment (typical cases).– Volgograd, 2005.– 84 p.
6. Lakin B.F. Biometry.– Moscow: Vysshaya shkola, 1990. – 254p.
7. Orlov A.I. High statistical technologies// Zavodskaya laboratoriya. – 2003.– Vol. 69, N11.– P. 55–60.
8. Ostashko F.I. Biotechnology of cattle reproduction. – Kiev: Naukova dumka, 1995. – 195 p.
9. Chubukova I.A. Data mining: Manual.– Moscow, 2006.– 382 p.

Accepted in 25.06.2010